



GFP-eNOS融合蛋白質の細胞内分布と酵素学的性質について

遠山, 一成

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Date of Publication)

2013-06-26

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2453

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002453>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



GFP-eNOS 融合蛋白質の細胞内分布と酵素学的性質について

遠 山 一 成

神戸大学大学院医学系研究科循環動態医学講座
呼吸循環器外科学研究分野

連絡先：遠 山 一 成

循環動態医学講座 呼吸循環器外科学研究分野

650-0017 神戸市中央区楠町 7-5-2

Tel. 078-382-5942

Fax. 078-382-5959

(平成14年1月7日受付)

要 約

目的：内皮型 NO 合成酵素（以下 eNOS）はこれまで様々な細胞の生理的応答に関与することが報告されてきたが、その細胞内輸送に関しては不明な点も多い。eNOS の細胞内挙動を調べるために、牛由来 eNOS に緑色蛍光蛋白質（以下 GFP）を融合させたプラスミドを 2 種類作成して COS7 細胞内に導入、発現させ、GFP-eNOS 融合蛋白質の細胞内分布と酵素学的性質を調べた。

結果：eNOS の C 末端に GFP を融合させた蛋白質（以下 GFPN₃-eNOS）は核の近傍に強い集積が認められたのに対して、eNOS の N 末端に GFP を融合させた蛋白質（以下 GFPC₁-eNOS）は核外の細胞質部分に存在し GFPN₃-eNOS 様の集積は認められなかった。低温下 SDS-PAGE では GFPN₃-eNOS は二量体形成が認められたのに対して GFPC₁-eNOS は安定な二量体形成は認められなかった。薄層クロマトグラフィー法 (TLC) を用いた NOS 活性測定ではアルギニンからシトルリンへの変換比が GFPN₃-eNOS で $16.38 \pm 1.43\%$ 、GFPC₁-eNOS が $7.80 \pm 0.66\%$ と GFPN₃-eNOS の活性は GFPC₁-eNOS と比較して有意に高かった。

結論：eNOS の C 末端に GFP を融合させると酵素活性は維持され核の近傍に強い集積が認められたことから、eNOS の生理的な細胞内の状態を調べるのに適切なモデルであると考えられた。一方、eNOS の N 末端に GFP を融合させた場合は安定な二量体形成が認められず、このことによって細胞内局在に変化を及ぼしていることが示唆された。

緒 言

内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) はこれまで様々な細胞

の生理的応答に関与することが報告されてきた。しかしながらその細胞内輸送に関しては不明な点も多い。

生理活性物質の生体内での動きを調べる方法として緑色蛍光蛋白質 (GFP) をレポーター蛋白として用いる方法が行われており⁽¹⁻⁴⁾、これまでに eNOS の C 末端に GFP を融合させたプラスミドを NIH3T3 細胞に導入、発現させると融合蛋白質はゴルジ体に局限して分布するという報告がなされている^(5, 6)。

一方 eNOS の N 末端に GFP を融合させた蛋白質の細胞内分布や酵素学的性質はこれまで研究されておらず、両者間の相違の有無、またその原因等は解明されていない。

今回我々は 2 種類 (N 末端, C 末端) の GFP-eNOS 融合蛋白質を COS7 細胞に発現させ、その細胞内分布と酵素学的性質を検索した。

方 法

① pEGFPN₃-eNOS プラスミドの作成

図 1 に示すように pEGFPN₃、pEGFPC₁ (N-terminal,

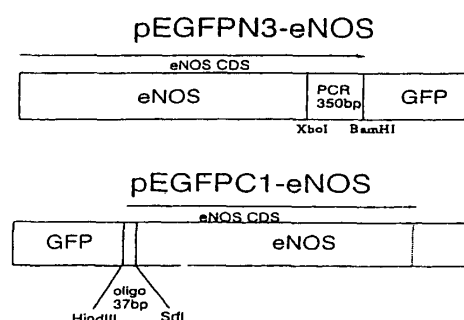


図1 pEGFPN₃-eNOS と pEGFPC₁-eNOS の模式図
eNOS の C 末端及び N 末端と各々の pEGFP が融合蛋白質を形成するように作成した。

キーワード：eNOS, GFP, 細胞内分布, 翻訳後修飾, 二量体, 酵素活性

C-terminal Enhanced Green Fluorescent Protein Vectors) (Clontech, Palo Alto, USA) の2つのプラスミドに牛由来 eNOS cDNA clone (Emory 大学 David. G. Harrison 教授より供与) の coding sequence を組み込んだ。pEGFPN₃-eNOS の作成は eNOS の C 末端側の coding sequence と融合蛋白質を作るように設計した。まず 5'-ACAGGACATCCTGAGAAC-3', 5'-CAGTGGATCCGGGACCAGGGGAGTCTGGTCCAGGTGGGT-3' をプライマーとして 95°C 15 秒, 55°C 20 秒, 72°C 40 秒, 30 サイクルで PCR を行い eNOS cDNA の 3299 番から 3647 番を増幅した。この PCR 産物を pBluescript II KS フェージミド (Stratagene, La Jolla, USA) にクローニング後 T7 プライマー (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3') を用いてシーケンシングを行い (ABI377-PRISM), 塩基配列に誤りのないことを確認した。次いで XhoI 及び BamHI で末端を処理し pEGFPN₃ に組み込んだ (以下 pEGFPN₃-PCR)。PCR 産物よりも上流側の eNOS coding sequence は eNOS cDNA clone 由来の XhoI-SalI 断片を用い, それを pEGFPN₃-PCR の XhoI, SalI サイトに組み込んだ。

pEGFPC₁-eNOS の作成にはまず eNOS 蛋白の1番から11番までのアミノ酸に相当するオリゴヌクレオチド (5'-AGCTATGGGCAACTTGAAGAGTGTGGGCCAGGAGCCA-3'(sense), 5'-TGGCTCCTGGCCCACTCTCAAGTTGC CCAT-3'(antisense)) を6%尿素変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し, 各々のオリゴヌクレオチドを回収した。これらのオリゴヌクレオチドを加熱, 冷却にて二本鎖にした後, 15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて二本鎖 DNA に相当する DNA を回収した。eNOS cDNA clone を EcoRI サイトで pEGFPC₁ に順方向に導入したプラスミドを作成し, このプラスミドの HindIII, SrfI サイトに精製した合成二本鎖 DNA を組み込んだ。各々のプラスミドに導入した eNOS coding sequence と GFP 部分との frame が一致することはシーケンシングを行い確認した。

②pEGFP-eNOS プラスミドの COS7 細胞への導入, 発現

COS7細胞を10% FBS (Trace Scientific, Australia) 含有 DMEM (日水製薬, 東京) 培地中で培養し, 約70% confluent の段階で Effectene Transfection Reagent (Qiagen, Valencia, USA) を用い GFPN₃, GFPN₃-eNOS, GFPC₁-eNOS の各々の融合蛋白質を COS7 細胞内に発現させた。

③GFP-eNOS 融合蛋白質の細胞内分布の観察

Transfection 後24時間の時点で蛍光顕微鏡下, 青色励起フィルター (EX450-490, DM505, BA520) を用い GFP-eNOS 融合蛋白質の COS7 細胞内における分布を観察した。

④GFP-eNOS 融合蛋白質の精製

Transfection後48時間の時点で0.05% trypsin, 0.02% EDTA入りPBSを用い, pEGFPN₃-eNOS, pEGFPC₁-eNOS で transfection した細胞を10cm dish 1枚分ずつ回収し, trypsin を不活化後にペレットを25mM TBS pH7.4 100μl に浮遊させた。次いで蛍光プレートリーダー (Bio tek instruments 社製 FLx800) の96穴透明プレートに細胞浮遊液5μlとTBS 60μlを加え, GFPの蛍光量を測定し相対融合蛋白量を算出した。次いで可溶化用緩衝液 (10% glycerol, 10mM CHAPS, 1mM PMSF, 2μM leupeptin, 1μM pepstatin) に懸濁し超音波破碎機を用いて可溶化した。等量の相対融合蛋白量を含む上清を可溶化用緩衝液で平衡化した 2'5'ADP Sepharose (200μl) に加え NOS を吸着させた。吸着後可溶化用緩衝液 500μl で2回洗浄後20mM NADPH 入り可溶化用緩衝液 100μl で抽出した⁽⁷⁾。

⑤低温下 SDS-PAGE

GFP-eNOS 融合蛋白溶液に等容量の2×SDS-PAGE 用緩衝液 (0.1M Tris-HCl pH6.8, 4% SDS, 8% β-mercaptoethanol, 10% glycerol, 2mg/ml BPB) を加え泳動用サンプルを調整した。サンプル混合時に前述の融合蛋白量比に基づいて蛋白量を揃え, 5分間煮沸したサンプルと非加熱のサンプルとを作成し, 低温下 (4°C) SDS-PAGE (separation gel 5%, stacking gel 3%) を行った⁽⁸⁻¹⁰⁾。泳動後 nitrocellulose membrane (Optitran BA-S 83, Schleicher & Schuell, Keene, USA) に semi-dry blotting し, 乾燥固定させた後に一次抗体としてウサギ polyclonal 抗体 (Clontech, Palo Alto, USA) または mouse mono-clonal 抗eNOS 抗体 (BD Transduction Laboratories, Lexington, USA) を用い, 二次抗体以降の反応に VECTASTAIN Elite ABC キット (フナコシ, 東京), 発色に DAB 基質キット (フナコシ, 東京) をそれぞれ用い, eNOS 及び GFP の検出を行った。また同様の方法で 2'5'ADP Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) より抽出した溶液に対しても SDS-PAGE を施行し, NOS 蛋白が回収されていることを確認した。

⑥GFP-eNOS 融合蛋白質の酵素活性

GFP-eNOS 融合蛋白質の酵素活性を arginine から citrulline への変換比で測定した。NOS 反応用緩衝液 (50mM Tris-HCl pH7.4, 2.0mM NADPH, 1.0mM CaCl_2 , 2 g/ml BH_4 , 50mM valine, 1.5mM ornithine, 10mM CHAPS, $1\mu\text{l}$ ^{14}C arginine (300 mCi/mmol 以上, 50 Ci/ml, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)) $20\mu\text{l}$ に 2'5'ADP Sepharose により溶出した液を $5\mu\text{l}$ 加え 37°C で酵素反応を 20 分行い, $70\mu\text{l}$ の 100% メタノール添加により反応を停止させた。また反応用緩衝液に 1mM L-NAME あるいは 10mM EGTA を添加した条件での酵素反応も行った。反応液中の arginine, citrulline の分離並びに定量は薄層クロマトグラフィー法 (以下 TLC) を用いた^(11, 12)。反応後各サンプルを TLC sheet (Merck, Darmstadt, Germany) に $5\mu\text{l}$ ずつ準備し乾燥後, 展開溶媒としてアンモニア水, クロロホルム, メタノール, 蒸留水を 2 : 0.5 : 4.5 : 1 で混合した溶液を用いて展開した。展開後プレートを乾燥させ, BAS-MS imaging plate (富士フィルム) に一晩接触させた後に BAS-1500 (富士フィルム) で読み取り, MacBAS (ver2.52) を用いて各サンプルの citrulline 部分の RI 量と全体の RI 量を測定し, citrulline への変換率を計算した。

⑦統計分析

GFP-eNOS 融合蛋白質の酵素活性の測定には独立した transfection を 3 回行い, それぞれのサンプルを 3 点で測定した。検定には分散分析 (ANOVA) の post hoc test を用い, 危険率 5 % を棄却域とした。

結 果

① 2 種類の GFP-eNOS 融合蛋白質の COS7 細胞内での分布の相違

図 2 に示すように, eNOS の C 末端に GFP を融合させた蛋白質 (GFPN₃-eNOS) は核の近傍に強い集積が認められたのに対して, eNOS の N 末端に GFP を融合させた蛋白質 (GFPC₁-eNOS) は核外の細胞質に存在し GFPN₃-eNOS 様の集積は認められなかった。GFP 単独では細胞全体が蛍光を持ち, GFP-eNOS 融合蛋白質のいずれとも異なった蛍光像を示した。

② 2 種類の GFP-eNOS 融合蛋白質の二量体形成の相違

図 3 に示すように, GFPN₃-eNOS は SDS 抵抗性

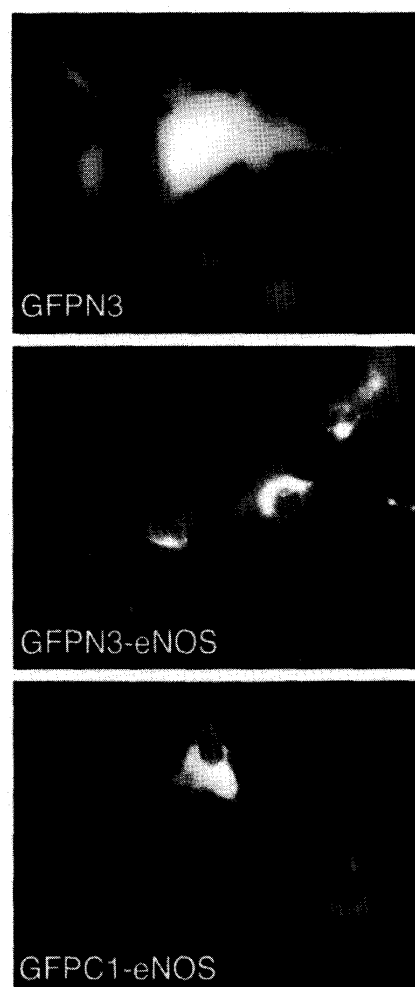


図 2 transfection 24 時間後の GFP-eNOS 融合蛋白質の COS7 細胞内における蛍光像。

GFPN₃-eNOS は核の近傍に強い集積が認められたのに対して, GFPC₁-eNOS は核外の細胞質に存在し GFPN₃-eNOS 様の集積は認められなかった。GFP 単独では細胞全体が蛍光を持つ像が認められた。

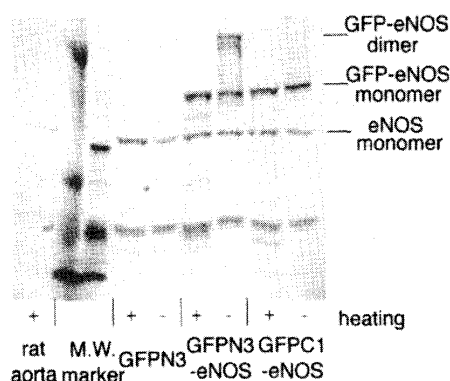


図 3 低温下 SDS-PAGE による GFP-eNOS 融合蛋白質の二量体形成の有無の確認。

GFPN₃-eNOS は二量体形成が認められたのに対して, GFPC₁-eNOS は安定な二量体形成は認められなかった。また泳動前の煮沸によって二量体は解体され単量体となった。

の二量体形成が認められたのに対して, GFPC₁-eNOS では安定な二量体形成は認められなかった。泳動前の煮沸によって二量体は見られなくなった。また GFPN₃-eNOS, GFPC₁-eNOS のいずれの融合蛋白質も 2'5'ADP Sepharose 抽出液中に認められ, 樹脂への吸着, 回収率に差は認められなかった。

③ 2 種類の GFP-eNOS 融合蛋白質の酵素活性の相違

図 4a, 4b に示すように, arginine から citrulline への変換率が GFPN₃-eNOS で $16.38 \pm 1.43\%$, GFPC₁-eNOS が $7.80 \pm 0.66\%$ と GFPN₃-eNOS の活性は GFPC₁-eNOS と比較して有意に高かった。また L-NAME, EGTA 添加によって GFPN₃-eNOS の変換率はそれぞれ $4.65 \pm 0.60\%$, $4.52 \pm 0.33\%$ と低下し, NOS 活性は抑制された。

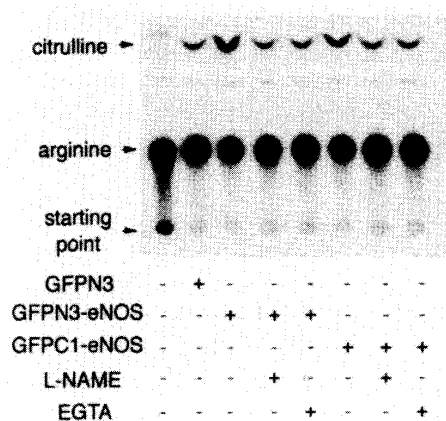


図 4a 薄層クロマトフラフィー法による citrulline, arginine の分類

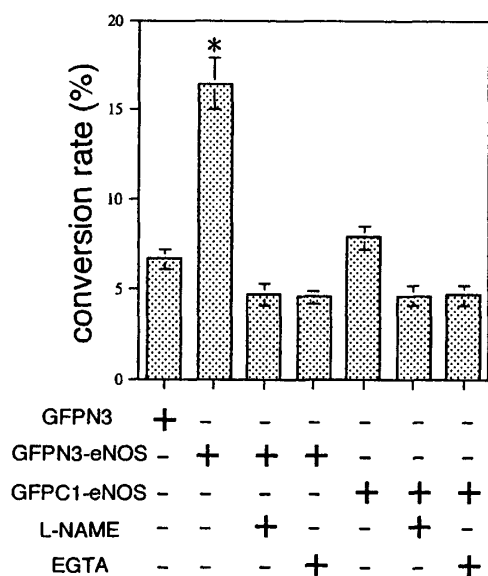


図 4b arginine から citrulline への変換率。

GFPN₃-eNOS は GFPC₁-eNOS と比較して有意に NOS 活性が高く, L-NAME, EGTA 投与によって活性は抑制された。(* $p < 0.01$ ANOVA post hoc test)

考 察

eNOS は他の蛋白質と同様に粗面小胞体で mRNA の情報を翻訳して合成される。しかし酵素としての完全な活性を持つためには, acylation 等の適切な翻訳後修飾が必要とされている⁽¹³⁻¹⁵⁾。更に eNOS の場合, 生理的条件下では細胞膜近傍に存在すると言われており, この細胞内極在と翻訳後修飾との関係が示唆されている⁽¹⁶⁻²¹⁾。Liu⁽⁵⁾, Robinson⁽²²⁾らは, eNOS の場合, N 末端より 2 番目の glycine の myristoylation と N 末端より 15 番目及び 26 番目の cysteine の palmitoylation が適切な細胞内分布に不可欠であると主張している。

また GFPN₃-eNOS, GFPC₁-eNOS のいずれの融合蛋白質も 2'5'ADP Sepharose への吸着, 回収率に差は認められなかったことから少なくとも eNOS の NADPH domain は分子構造が保たれており, GFP との融合蛋白質形成による NOS 蛋白の構造変化は大きくないと考えられる。

今回の我々の実験では GFPN₃-eNOS は核の近傍に強い集積が認められたのに対して, GFPC₁-eNOS は核外の細胞質に存在し GFPN₃-eNOS 様の集積は認められなかった。また GFPN₃-eNOS は SDS 抵抗性の二量体形成が認められたのに対して, GFPC₁-eNOS では安定な二量体形成は認められなかった。eNOS は二量体となって初めて酵素として活性を持つことはこれまでに報告されているが, 二量体形成の有無が eNOS の細胞内分布に影響を与えるか否かはこれまでに報告がない。二量体になれないことでゴルジ体等との相互作用に変化が生じ, その結果細胞内分布が変化した可能性が有るが, この機序の全容解明は将来の課題である。

GFPC₁-eNOS の二量体形成が抑制された理由として GFP が eNOS の N 末端に来ることによって直接二量体形成を抑制したのか, それとも適切な翻訳後修飾が阻害された結果, 二量体形成が抑制されたのかは確定できなかった。Venema らは eNOS の二量体形成に必要なのは heme domain 間の結合だけであって, eNOS の完全な活性に必要な不可欠な物質である calmodulin や BH₄, または myristoylation は必要ないと主張している⁽²³⁾。今回の我々の結果は GFP が eNOS の N 末端に来ることによって heme domain 間の結合が阻害されたことを示唆した。

eNOS-GFP 融合蛋白質は NIH3T3 細胞内でゴルジ体マーカーである mannosidaseII と同一部位に分布したという報告が有り⁽⁵⁾, 今回の GFPN₃-eNOS の COS7 細胞内での核の近傍の強い集積はゴルジ体には有

と考えられた。生理的な状態では eNOS はゴルジ体で acylation 後、細胞膜上の caveolae に小胞輸送され、そこで酵素として働くと言われている⁽²⁴⁻³³⁾。また caveolae に輸送されるためにはゴルジ体で caveolin-1 と eNOS が結合することが必要であると報告されている^(24-29, 33)。今回の場合 COS7 細胞内で GFPN₃-eNOS を過剰発現させたため、GFPN₃-eNOS に対する caveolin-1 等の因子が相対的に不足し caveolae に輸送できなかった GFPN₃-eNOS がゴルジ体に蓄積したのが、蛍光顕微鏡で見られた核の近傍の強い集積であると示唆された。

GFPN₃-eNOS は GFPC₁-eNOS と比較して有意に NOS 活性が高くなった。この酵素活性は L-NAME, EGTA によって有意に低下したことにより eNOS によるものと考えられた。また GFPN₃-eNOS 群は酵素反応に必要な補酵素や基質を付加することにより強い酵素反応が認められたことから、蓄積されているゴルジ体の中では機能を有する状態であると考えられた。

今回我々は 2 種類の GFP-eNOS 融合蛋白質の細胞内分布及び酵素学的性質の相違を発見した。eNOS の C 末端に GFP を融合させると酵素活性は維持され核の近傍に強い集積が認められたことから eNOS の生理的な細胞内の状態を観察するのに適切なモデルであると考えられた。一方 eNOS の N 末端に GFP を融合させた場合は安定な二量体形成が認められず、このことによって細胞内局在に変化を及ぼしていることが示唆された。

謝 辞

この研究を御指導頂いた香川医科大学大学第二生理学教室 小坂博昭教授、山本憲助手に深謝する。

文 献

1. Prasher, D.C., Eichenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J.: Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111 : 229-233, 1992
2. Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G., Ward, W.W.: Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* 32 : 1212-1218, 1993
3. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C.: Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263 : 802-805, 1994
4. Marshall, J., Raymond, M., Moss, G.W.J., Howe, J.R., Hughes, T.E.: The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function. *Neuron* 14 : 211-215, 1995
5. Liu, J., Hughes, T.E., Sessa, W.C.: The first 35 amino acids and fatty acylation sites determine the molecular targeting of endothelial nitric oxide synthase into the Golgi region of cells: A greenfluorescent protein study. *J. Cell. Biol.* 137 : 1525-1535, 1997
6. Sowa, G., Liu, J., Papapetropoulos, A., Rex-Haffner, M., Hughes, T.E., Sessa, W.C.: Trafficking of endothelial nitric oxide synthase in living cells. *J. Biol. Chem.* 274 : 22524-22531, 1999
7. Pollock, J.S., Forstermann, U., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Schmidt, H.H.H.W., Nakane, M., Murad, F.: Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 10480-10484, 1991
8. Klatt, P., Schmidt, K., Lehner, D., Glatter, O., Baechinger, H.P., Mayer, B.: Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer. *EMBO J.* 14 : 3687-3695, 1995
9. Rodriguez-Crespo, I., Gerber, N.C., Ortiz de Montellano, P.R.: Endothelial nitric oxide synthase: expression in *Escherichia coli* spectroscopic characterization and role of tetrahydrobiopterin in dimer formation. *J. Biol. Chem.* 271 : 11462-11467, 1996
10. Rodriguez-Crespo, I., Ortiz de Montellano, P.R.: Human endothelial nitric oxide synthase: expression in *Escherichia coli*, coexpression with calmodulin, and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 336 : 151-156, 1996
11. Sessa, W.C., Hecker, M., Mitchell, J.A., Vane, J.R.: The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: L-glutamine inhibits the generation of L-arginine by cultured endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA 87 : 8607-8611, 1990
12. Kumar, V.B., Bernardo, A.E., Alshaher, M.M., Buddhiraju, M., Purushothaman, R., Morley, J.E.: Rapid assay for nitric oxide synthase using thin layer chromatography. *Anal. Biochem.* 269 : 17-20, 1999
 13. Sakoda, T., Hirata, K., Kuroda, R., Miki, N., Suematsu, M., Kawashima, S., Yokoyama, M.: Myristoylation of endothelial cell nitric oxide synthase is important for extracellular release of nitric oxide. *Mol. Cell. Biochem.* 152 : 143-148, 1995
 14. Liu, J., Garcia-Cardena, G., Sessa, W.C.: Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization. *Biochemistry* 35 : 13277-13281, 1996
 15. Feron, O., Michel, J.B., Sase, K., Michel, T.: Dynamic regulation of endothelial nitric oxide synthase: complementary roles of dual acylation and caveolin interactions. *Biochemistry* 37 : 193-200, 1998
 16. Sessa, W.C., Barber, C.M., Lynch, K.R.: Mutation of N-myristoylation site converts endothelial cell nitric oxide synthase from a membrane to a cytosolic protein. *Circ. Res.* 72 : 921-924, 1993
 17. Busconi, L., Michel, T.: Endothelial nitric oxide synthase: N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 268 : 8410-8413, 1993
 18. Robinson, L.J., Busconi, L., Michel, T.: Agonist-modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 270 : 995-998, 1995
 19. Liu, J., Garcia-Cardena, G., Sessa, W.C.: Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase: mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines-15 and/or -26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme. *Biochemistry* 34 : 12333-12340, 1995
 20. Shaul, P.W., Smart, E.J., Robinson, L.J., German, Z., Yuhanna, I.S., Ying, Y., Anderson, R.G.W., Michel, T.: Acylation targets endothelial nitric oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J. Biol. Chem.* 271 : 6518-6522, 1996
 21. Prabhakar, P., Cheng, V., Michel, T.: A chimeric transmembrane domain directs endothelial nitric oxide synthase palmitoylation and targeting to plasmalemmal caveolae. *J. Biol. Chem.* 275 : 19416-19421, 2000
 22. Robinson, L.J., Michel, T.: Mutagenesis of palmitoylation sites in endothelial nitric oxide synthase identifies a novel motif for dual acylation and subcellular targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 11776-11780, 1995
 23. Venema, R.C., Ju, H., Zou, R., Ryan, J.W., Venema, V.J.: Subunit interactions of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 272 : 1276-1282, 1997
 24. Feron, O., Belhassen, L., Koblik, L., Smith, T.W., Kelly, R.A., Michel, T.: Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae: specific interaction with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 271 : 22810-22814, 1996
 25. Garcia-Cardena, G., Fan, R., Stern, D.F., Liu, J., Sessa, W.C.: Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 271 : 27237-27240, 1996
 26. Ju, H., Zou, R., Venema, V.J., Venema, R.C.: Direct interaction of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J. Biol. Chem.* 272 : 18522-18525, 1997
 27. Michel, J.B., Feron, O., Sacks, D., Michel, T.: Reciprocal regulation of endothelial nitric oxide synthase by Ca-calmodulin and caveolin. *J. Biol. Chem.* 272 : 15583-15586, 1997
 28. Michel, J.B., Feron, O., Sase, K., Prabhakar, P., Michel, T.: Caveolin versus calmodulin: counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 272 : 25907-25912, 1997
 29. Garcia-Cardena, G., Martasek, P., Masters, B.S.S., Skidd, P.M., Couet, J., Li, S., Lisanti, M.P., Sessa, W.C.: Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin: functional significance of the NOS caveolin binding domain in vivo. *J. Biol. Chem.* 272 : 25437-25440, 1997
 30. Feron, O., Saldana, F., Michel, J.B., Michel, T.: The endothelial nitric oxide synthase-

- caveolin regulatory cycle. J. Biol. Chem. 273 : 3125-3128, 1998
31. Gratton, J.P., Fontana, J., O'Connor, D.S., Garcia-Cardena, G., McCabe, T.J., Sessa, W.C.: Reconstitution of an endothelial nitric oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro: evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. J. Biol. Chem. 275 : 22268-22272, 2000
32. Li, H., Brodsky, S., Basco, M., Romanov, V., De Angelis, D.A., Goligorsky, M.S.: Nitric oxide attenuates signal transduction: possible role in dissociating caveolin-1 scaffold. Circ. Res. 88 : 229-236, 2001
33. Govers, R., Rabelink, T.J.: Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 280 : F193-F206, 2001

Intracellular distribution and enzymatic activity of GFP-eNOS fusion protein

Kazushige Toyama

Division of Cardiovascular, Thoracic and Pediatric Surgery,
Department of Cardio-Pulmonary and Vascular Medicine,
Kobe University Graduate School of Medicine

The endothelial nitric oxide synthase (eNOS) plays important roles in various physiological responses. It is suggested that enzymatic activity of eNOS is closely related to its localization and post-translational modifications such as acylation.

To investigate intracellular eNOS distribution between compartments in vivo, bovine eNOS gene was cloned into pEGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein Vector) plasmids and transfected to COS7 cells. When GFP was located at the N-terminus of eNOS (GFPC₁-eNOS), the fluorescence showed diffuse cytosolic distribution. On the other hand, when GFP was fused to C-terminus (GFPN₃-eNOS), the fluorescence showed its accumulation at perinuclear region. This perinucleus distribution pattern was compatible with a previous report that the eNOS was located on the Golgi complex in non stimulated cells. Low temperature SDS-PAGE showed that the GFPN₃-eNOS formed dimer in vivo, but we didn't detect the dimer formation in GFPC₁-eNOS transfected cells. Thin layer chromatography (TLC) showed that NOS activity of the GFPN₃-eNOS was significantly higher than that of the GFPC₁-eNOS.

GFPN₃-eNOS is an suitable model for investigating physiological intracellular distribution of the eNOS because of high NOS value. Intracellular eNOS distribution of GFPC₁-eNOS is different from that of GFPN₃-eNOS perhaps because the interaction between protein and membrane has changed due to suppression of dimer formation in GFPC₁-eNOS